



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 09 688.7

**Anmeldetag:** 28. Februar 2001

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Neue für die Gene metR und metZ kodierende Nukleotidsequenzen

**Priorität:** 2.9.2000 DE 100 43 335.9

**IPC:** C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Weihmayr

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE metR and metZ GENES

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60/294,224, filed May 31, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 43 335.9	SEPTEMBER 2, 2000
GERMANY	101 09 688.7	FEBRUARY 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

*Corwin Paul Umbach*  
CORWIN PAUL UMBACH Reg No 40,211

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Robert W. Hahl  
Registration No. 33,893



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



**Neue für die Gene metR und metZ kodierende  
Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für die Gene metR und metZ  
kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien  
5 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von  
Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, durch Abschwächung  
des metR- und/oder metZ-Gens.

Stand der Technik

10 L-Aminosäuren, insbesondere Methionin, finden in der  
Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der  
Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der  
Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von  
Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere  
15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der  
Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen  
können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel  
Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die  
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die  
Zuckerkonzentration während der Fermentation oder die  
Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel  
Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen  
Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst  
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser  
Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion  
und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man  
Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph  
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die  
Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene  
5 amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von  
10 Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-  
15 Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,  
20 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide aus coryneformen Bakterien, die Polynukleotidsequenzen enthalten die für die Gene metR und/oder metZ kodieren,  
25 ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit  
30 einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,

- c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 5 d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
- 10 e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) c) oder d), und
- f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e),
- wobei die Polypeptide gemäß a) oder c) bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsaktivators MetR und die Polypeptide gemäß b) oder d) bevorzugt die Aktivität der O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase (MetZ) aufweisen.
- 15 Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls die oben genannten Polynukleotide, wobei es sich bevorzugt um replizierbare DNA handelt, enthaltend:
- 20 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 25 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
- 30 Weitere Gegenstände sind:

eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz,  
wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
5 beziehungsweise SEQ ID No. 3 dargestellt, enthält,

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen  
Polynukleotid, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende  
Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das metR-Gen und/oder  
10 das metZ-Gen abgeschächt wird insbesondere durch  
Deletion, Insertion oder Basenaustausch.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im  
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die  
erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung  
15 einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,  
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit  
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen  
Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon  
enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA  
und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise  
Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die  
für den Transkriptions-aktivator MetR und/oder die O-  
25 Succinylhomoserin-Sulfhydrylase kodieren oder um solche  
Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren,  
die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des  
Transkriptionsaktivator MetR-Gens und/oder der des O-  
Succinylhomoserin-Sulfhydrylase-Gens aufweisen.

30 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren  
Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen  
hergestellt werden kann, die für den

Transkriptionsaktivator MetR und/oder die O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide  
enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz  
5 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende  
Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit  
einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.  
Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge  
von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden  
10 geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld  
herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf  
Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es  
15 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte  
RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein  
Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus  
hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu  
20 wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders  
zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem  
Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus  
hergestellten Fragments.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen die Polypeptide  
25 gemäß SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3, insbesondere solche  
mit der biologischen Aktivität des Transkriptionsaktivators  
MetR und der O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase und auch  
solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens  
80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind  
30 mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3  
und die genannten Aktivitäten aufweisen.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren produzieren und in denen die für das metR-Gen und/oder für das metZ-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen, beziehungsweise Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert, beziehungsweise das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme



Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende  
10 Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-  
Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

Die neuen, für den Transkriptionsaktivator MetR und das  
Enzym O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase kodierenden Gene  
15 metR und metZ von C. glutamicum wurden isoliert.

Zur Isolierung des metR-Gens, des metZ-Gens oder auch  
anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank  
dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli)  
angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein  
20 bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben.  
Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und  
Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag  
Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von  
Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual  
25 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine  
sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes  
W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  
λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and  
General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine  
30 Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des  
Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of  
the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.  
coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids  
Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue, für die Gene *metR* und *metZ* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine abgeleitet. In SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 sind die sich ergebenden Aminosäuresequenzen der *metR*- und *metZ*-Genprodukte dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind

weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen  
5 Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann  
10 unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
15 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 3 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der  
20 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

25 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.  
30 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, d.h., es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind.  
35 Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung

einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,

1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des metR- und/oder des metZ-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des metR- und/oder des metZ-Gens oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological

Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al.  
(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762  
(1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus  
Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen  
5 Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des  
Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich,  
Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen  
können bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine  
10 Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen  
werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,  
Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit  
von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die  
15 Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense  
mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“)   
gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens  
einem Basenpaar in einem Gen führen zu  
Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in  
20 deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die  
Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren  
Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen  
Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung  
derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und  
25 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers  
(„Molekulare Genetik“, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag,  
Stuttgart, Deutschland, 1997), dem von Winnacker („Gene und  
Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,  
30 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, 4.  
Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1999) entnommen  
werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu  
mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology  
35 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung

(„gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines „cross over“-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross over“-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden „cross-over“-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz, erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das *metR*-Gen oder das *metZ*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *metR*-Gens und/oder des *metZ*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

So kann für die Herstellung von L-Methionin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),



- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931),
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Methionin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des metR und/oder metZ Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),
- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),

- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151)
- das für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- 5 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des metR-Gens und/oder des metZ-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in:
- 15 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
- 20 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel
- 25 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology„ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie  
5 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,  
Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum  
Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett,  
Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure  
und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und  
10 Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure  
verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als  
Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff- haltige  
Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,  
15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff  
oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,  
Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und  
Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen  
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

20 Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung von  
Methionin, können organische und anorganische  
schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide,  
Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogen-  
25 phosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die  
entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen  
enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder  
Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.  
30 Schließlich können essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren  
und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen  
eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies  
geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten  
Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen

Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak  
5 beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität  
10 von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur  
15 liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

20 Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation  
zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30%  
25 der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf  $\geq 0$  bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin  
30 haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt  
35 oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird

diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert.

5 Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.

10 Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen  
15 organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung  
20 finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5  
25 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte  
30 mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 200 bis 2000 µm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile (< 5 %) an Korngrößen unter 20 µm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der  
35 Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die

entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische

Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu 10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

10 Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-  
15 Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin  
20 E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Humarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls  
25 erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines  
30 geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder  
35 Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist

gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren  
5 Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs  
10 beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%,  
15 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt  
20 weniger als 2 Gew.-%.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen,  
(● gekennzeichnet durch die Schritte

- 25 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 30 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und



- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

5 Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- 10 f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 15 g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

25 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)

30

durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.

5 entnommen werden.

### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

10 Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032  
wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)  
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI  
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell  
15 gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer  
Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,  
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1  
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of  
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
20 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
25 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
30 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit

Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 5 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
- 10 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

- 15 Isolierung und Sequenzierung der Gene metR und metZ

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer

20 Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- 30 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product

No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei  
5 das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et  
10 al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,  
15 Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin  
20 Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,  
25 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids  
30 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research,  
35 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab zwei offene Leseraster von 567 Basenpaaren und 1146 Basenpaaren, welche als metR-Gen und metZ-Gen bezeichnet wurden. Das  
5 metR-Gen kodiert für ein Protein von 189 Aminosäuren, das metZ-Gen kodiert für ein Protein von 382 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 <120> Neue für die Gene metR und metZ kodierende  
Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000369 BT

10 &lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 3

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2628

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (447)..(1013)

25 &lt;223&gt; metR-Gen

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1038)..(2183)

30 &lt;223&gt; metZ-Gen

&lt;400&gt; 1

```

cggtcacgtt gggatcgttg tcaaaactcc ccagtggttt cacttcataa actcgcggag 60
35 ttttcogggg aactgaaaaa catcgctcga taggccagcg tctaattcag cagcgatttc 120
   ggcagcaagc ccagcgccat taatcagagc ggtgaaataa acatggttca tgattatgtc 180
   aggacggtaa ttagacttat gaccaggttt aaggagggtca ccagggttgaa gccgcgctat 240
40 tgttcogtgg aaaagggggc cctgatctag ctgattattc atcgcagtaa ggcgtttcgg 300
   taggtgggtg aatcatcgta gtcttccgag ccccgtagcc cgatccgttt tgtgcaatcc 360
45 aatgctactc ccacagagcg ggctactttc tctaaaaatg ttctcatagt agataaaatt 420
   gttcttaaag cgacattatt gtctgc atg gaa gac gat ctc agt gct gct ctc 473
                               1           5
                               Met Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Leu
50 gtc aaa gcg ctt ttc gac gcg cga acc caa cgc agg ctc tct atc tcg 521
   Val Lys Ala Leu Phe Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Leu Ser Ile Ser
   10           15           20           25
55 gcg tta gct gaa tcc tcc ggt gtg tcg cga gca atg att tcc cgc gtg 569
   Ala Leu Ala Glu Ser Ser Gly Val Ser Arg Ala Met Ile Ser Arg Val
           30           35           40

```

		gaa aac gca gag gcg caa cca agc gct gca tta ctt gga cgc ctt tcc	617
		Glu Asn Ala Glu Ala Gln Pro Ser Ala Ala Leu Leu Gly Arg Leu Ser	
		45 50 55	
5		ggg gca ttg ggt atg acg ctt tcg gag ctc att gca cag gct gaa ggt	665
		Gly Ala Leu Gly Met Thr Leu Ser Glu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Gly	
		60 65 70	
10		ggc tat gac cgg ggc gct cgg cgg tca aag cag tct gta tgg aca gat	713
		Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Arg Arg Ser Lys Gln Ser Val Trp Thr Asp	
		75 80 85	
15		cca gct acc ggt tac aca cgg cgt gca gtg tca cag ccg tca gaa tcc	761
		Pro Ala Thr Gly Tyr Thr Arg Arg Ala Val Ser Gln Pro Ser Glu Ser	
		90 95 100 105	
20		cca cta gaa cta gtg gaa gta atg ctg cct cct ggg gcg gaa gtt ggc	809
		Pro Leu Glu Leu Val Glu Val Met Leu Pro Pro Gly Ala Glu Val Gly	
		110 115 120	
25		tac cca gct gat gct tat cgt ttc atg gat cag gtg gtc tgg gta ctc	857
		Tyr Pro Ala Asp Ala Tyr Arg Phe Met Asp Gln Val Val Trp Val Leu	
		125 130 135	
30		gaa ggg gcc gtt cgt att act gaa ggt gaa gag gtc cac gaa ctt tca	905
		Glu Gly Ala Val Arg Ile Thr Glu Gly Glu Glu Val His Glu Leu Ser	
		140 145 150	
35		acg ggg gat tgt cta cgg ttt ggg cct ccg cga gat acc gac ttt gct	953
		Thr Gly Asp Cys Leu Arg Phe Gly Pro Pro Arg Asp Thr Asp Phe Ala	
		155 160 165	
40		aat ccc acc acc gta gcc act agg tat tta gtt gcc ttg gac aag cgt	1001
		Asn Pro Thr Thr Val Ala Thr Arg Tyr Leu Val Ala Leu Asp Lys Arg	
		170 175 180 185	
45		gta cct cgt gct tgatataaca agtaaggaag cctg atg aat ttt tac cca	1052
		Val Pro Arg Ala Met Asn Phe Tyr Pro	
		190	
50		cca tct gta cct att aac cct gcg tgg cgt cca ccc aca gta act gtg	1100
		Pro Ser Val Pro Ile Asn Pro Ala Trp Arg Pro Pro Thr Val Thr Val	
		195 200 205 210	
55		caa gcg gga cgg cca gcc aga act cct ggt gcg ccg atg aac cca cct	1148
		Gln Ala Gly Arg Pro Ala Arg Thr Pro Gly Ala Pro Met Asn Pro Pro	
		215 220 225	
60		atc acg ttg tcc agc act tat gtt cat gat tca gaa aaa gct tat ggg	1196
		Ile Thr Leu Ser Ser Thr Tyr Val His Asp Ser Glu Lys Ala Tyr Gly	
		230 235 240	
65		cgc gat ggc aat gat gga tgg ggt gca ttt gag gct gcc atg gga act	1244
		Arg Asp Gly Asn Asp Gly Trp Gly Ala Phe Glu Ala Ala Met Gly Thr	
		245 250 255	
70		cta gat ggt ggg ttc gcg gta tct tat tct tca ggt ttg gca gcg gca	1292
		Leu Asp Gly Gly Phe Ala Val Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Ala Ala Ala	
		260 265 270	

	acg	tcg	att	gct	gat	ttg	gtt	cct	act	ggg	ggc	aca	gtt	gtt	tta	cct	1340
	Thr	Ser	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Pro	
	275					280					285					290	
5	aaa	gct	gcc	tat	tat	ggc	gtg	acc	aat	att	ttc	gcc	agg	atg	gaa	gcc	1388
	Lys	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Val	Thr	Asn	Ile	Phe	Ala	Arg	Met	Glu	Ala	
					295					300					305		
10	cgc	gga	agg	ctg	aag	gtt	cga	act	gtt	gat	gca	gac	aat	acc	gaa	gaa	1436
	Arg	Gly	Arg	Leu	Lys	Val	Arg	Thr	Val	Asp	Ala	Asp	Asn	Thr	Glu	Glu	
				310					315					320			
15	gtg	att	gct	gct	gct	caa	ggg	gca	gat	gtg	gtg	tgg	gtg	gaa	tcg	atc	1484
	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Val	Val	Trp	Val	Glu	Ser	Ile	
			325					330					335				
20	gct	aat	ccg	acg	atg	gtg	gta	gct	gat	atc	cct	gca	ata	gtc	gac	ggg	1532
	Ala	Asn	Pro	Thr	Met	Val	Val	Ala	Asp	Ile	Pro	Ala	Ile	Val	Asp	Gly	
		340					345					350					
25	gtg	cgt	ggg	ctt	gga	gtt	ttg	act	gtc	gtt	gac	gcg	act	ttc	gca	acg	1580
	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Phe	Ala	Thr	
	355				360						365					370	
30	cca	ctt	cgt	caa	cgt	cca	ttg	gaa	ctt	ggg	gct	gat	att	gtg	ctt	tac	1628
	Pro	Leu	Arg	Gln	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	
					375					380					385		
35	tcg	gca	acc	aaa	ctt	atc	ggg	gga	cac	tct	gat	ctt	ctt	ctt	gga	gtc	1676
	Ser	Ala	Thr	Lys	Leu	Ile	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	
				390					395					400			
40	gca	gtg	tgc	aag	tct	gag	cac	cat	gcg	cag	ttt	ctt	gcc	act	cac	cgt	1724
	Ala	Val	Cys	Lys	Ser	Glu	His	His	Ala	Gln	Phe	Leu	Ala	Thr	His	Arg	
			405					410					415				
45	cat	gat	cat	ggg	tca	gtg	ccg	gga	ggg	ctt	gaa	gcg	ttt	ctt	gct	ctc	1772
	His	Asp	His	Gly	Ser	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Leu	
		420					425					430					
50	cgt	gga	ttg	tat	tcc	ttg	gcg	gtg	cgt	ctt	gat	cga	gca	gaa	tcc	aac	1820
	Arg	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ala	Val	Arg	Leu	Asp	Arg	Ala	Glu	Ser	Asn	
	435					440					445					450	
55	gca	gca	gaa	ctt	tcg	cgg	cga	ctt	aac	gcg	cat	cct	tcg	gtt	acc	cgc	1868
	Ala	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Arg	Leu	Asn	Ala	His	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	
					455					460					465		
60	gtc	aat	tat	cca	gga	ctt	cct	gat	gat	ccc	caa	cat	gaa	aaa	gcc	gtg	1916
	Val	Asn	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Pro	Gln	His	Glu	Lys	Ala	Val	
				470				475						480			
65	cga	gtc	cta	ccc	tct	gga	tgt	gga	aac	atg	ttg	tca	ttt	gag	ctt	gat	1964
	Arg	Val	Leu	Pro	Ser	Gly	Cys	Gly	Asn	Met	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Asp	
			485					490					495				



gca aca cct gaa cga act gat gag att ctc gaa agc ctg tca ctt tta 2012  
 Ala Thr Pro Glu Arg Thr Asp Glu Ile Leu Glu Ser Leu Ser Leu Leu  
 500 505 510

5 acc cac gcg acc agt tgg gga ggt gtg gaa aca gcc att gaa cgt cgc 2060  
 Thr His Ala Thr Ser Trp Gly Gly Val Glu Thr Ala Ile Glu Arg Arg  
 515 520 525 530

10 acc agg cgg gat gct gaa gtg gtg gca gga gta ccg atg act ctt tgc 2108  
 Thr Arg Arg Asp Ala Glu Val Val Ala Gly Val Pro Met Thr Leu Cys  
 535 540 545

15 cgc gtt tcc gta gga att gaa gac gtt gaa gat cta tgg gaa gac ctc 2156  
 Arg Val Ser Val Gly Ile Glu Asp Val Glu Asp Leu Trp Glu Asp Leu  
 550 555 560

aac gcc tca atc gac aaa gtt ctg ggt tagaactcgt agccagtaac 2203  
 Asn Ala Ser Ile Asp Lys Val Leu Gly  
 565 570

20 cagaccttca gtgtttggtt gccactccag tgctggggcg acatgatcag cgaagttctt 2263  
 caggatcgac gcgttgatct caacacccat ttggttgggg gcggtgagca tcaaggtgtc 2323  
 25 ggcttccatc acagctttgt cttccttgag ctgggtgatg agttcatcgg gacttccggc 2383  
 gtagctgcga ccgaacgtgg atcgggtatc atccaggatt cctacttggg caccgccttg 2443  
 30 tccctgaagt ccgaaaagct cacggtcgcg gtcggtgacg atcgggaaga tggacctgga 2503  
 gacagacaca cgtgggggtcc aatcgtgtcc ggcttctttc caagcttggc ggtagaacgc 2563  
 gatttgatcg gcttgcagat ccccgaagga ttggccggtg gcttcggcga cgagggtgga 2623  
 35 gctca 2628

<210> 2  
 <211> 189  
 40 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2  
 45 Met Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Leu Val Lys Ala Leu Phe Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Thr Gln Arg Arg Leu Ser Ile Ser Ala Leu Ala Glu Ser Ser Gly  
 20 25 30  
 50 Val Ser Arg Ala Met Ile Ser Arg Val Glu Asn Ala Glu Ala Gln Pro  
 35 40 45  
 Ser Ala Ala Leu Leu Gly Arg Leu Ser Gly Ala Leu Gly Met Thr Leu  
 50 55 60  
 55 Ser Glu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Gly Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Arg  
 65 70 75 80

Arg Ser Lys Gln Ser Val Trp Thr Asp Pro Ala Thr Gly Tyr Thr Arg  
                                     85                                    90                                    95  
 5 Arg Ala Val Ser Gln Pro Ser Glu Ser Pro Leu Glu Leu Val Glu Val  
                                     100                                    105                                    110  
 Met Leu Pro Pro Gly Ala Glu Val Gly Tyr Pro Ala Asp Ala Tyr Arg  
                                     115                                    120                                    125  
 10 Phe Met Asp Gln Val Val Trp Val Leu Glu Gly Ala Val Arg Ile Thr  
                                     130                                    135                                    140  
 Glu Gly Glu Glu Val His Glu Leu Ser Thr Gly Asp Cys Leu Arg Phe  
 15 145                                    150                                    155                                    160  
 Gly Pro Pro Arg Asp Thr Asp Phe Ala Asn Pro Thr Thr Val Ala Thr  
                                     165                                    170                                    175  
 20 Arg Tyr Leu Val Ala Leu Asp Lys Arg Val Pro Arg Ala  
                                     180                                    185  
 <210> 3  
 25 <211> 382  
     <212> PRT  
     <213> Corynebacterium glutamicum  
 <400> 3  
 30 Met Asn Phe Tyr Pro Pro Ser Val Pro Ile Asn Pro Ala Trp Arg Pro  
     1                                    5                                    10                                    15  
 Pro Thr Val Thr Val Gln Ala Gly Arg Pro Ala Arg Thr Pro Gly Ala  
                                     20                                    25                                    30  
 35 Pro Met Asn Pro Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr Tyr Val His Asp Ser  
                                     35                                    40                                    45  
 Glu Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Gly Asn Asp Gly Trp Gly Ala Phe Glu  
 40 50                                    55                                    60  
 Ala Ala Met Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Ala Val Ser Tyr Ser Ser  
     65                                    70                                    75                                    80  
 45 Gly Leu Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala Asp Leu Val Pro Thr Gly Gly  
                                     85                                    90                                    95  
 Thr Val Val Leu Pro Lys Ala Ala Tyr Tyr Gly Val Thr Asn Ile Phe  
                                     100                                    105                                    110  
 50 Ala Arg Met Glu Ala Arg Gly Arg Leu Lys Val Arg Thr Val Asp Ala  
                                     115                                    120                                    125  
 Asp Asn Thr Glu Glu Val Ile Ala Ala Ala Gln Gly Ala Asp Val Val  
 55 130                                    135                                    140  
 Trp Val Glu Ser Ile Ala Asn Pro Thr Met Val Val Ala Asp Ile Pro  
     145                                    150                                    155                                    160

Ala Ile Val Asp Gly Val Arg Gly Leu Gly Val Leu Thr Val Val Asp  
 165 170 175  
 5 Ala Thr Phe Ala Thr Pro Leu Arg Gln Arg Pro Leu Glu Leu Gly Ala  
 180 185 190  
 Asp Ile Val Leu Tyr Ser Ala Thr Lys Leu Ile Gly Gly His Ser Asp  
 195 200 205  
 10 Leu Leu Leu Gly Val Ala Val Cys Lys Ser Glu His His Ala Gln Phe  
 210 215 220  
 Leu Ala Thr His Arg His Asp His Gly Ser Val Pro Gly Gly Leu Glu  
 225 230 235 240  
 15 Ala Phe Leu Ala Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Leu Ala Val Arg Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Ala Glu Ser Asn Ala Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Asn Ala His  
 260 265 270  
 20 Pro Ser Val Thr Arg Val Asn Tyr Pro Gly Leu Pro Asp Asp Pro Gln  
 275 280 285  
 25 His Glu Lys Ala Val Arg Val Leu Pro Ser Gly Cys Gly Asn Met Leu  
 290 295 300  
 Ser Phe Glu Leu Asp Ala Thr Pro Glu Arg Thr Asp Glu Ile Leu Glu  
 305 310 315 320  
 30 Ser Leu Ser Leu Leu Thr His Ala Thr Ser Trp Gly Gly Val Glu Thr  
 325 330 335  
 Ala Ile Glu Arg Arg Thr Arg Arg Asp Ala Glu Val Val Ala Gly Val  
 340 345 350  
 35 Pro Met Thr Leu Cys Arg Val Ser Val Gly Ile Glu Asp Val Glu Asp  
 355 360 365  
 40 Leu Trp Glu Asp Leu Asn Ala Ser Ile Asp Lys Val Leu Gly  
 370 375 380

45

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, das eine Polynukleotidsequenz enthält die für die Gene metR und/oder metZ kodiert , ausgewählt aus der Gruppe
  - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,
  - c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 15 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 20 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
  - e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b), c) oder d), und
  - f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das 30 Polynukleotid eine RNA ist.

4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
  - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
  - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 und/oder SEQ ID No. 3 enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das metR-Gen und/oder metZ-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metR und/oder das metZ-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten Aminosäure verringern.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression  
des (der) Polynukleotids (e), das (die) für das metR  
und/oder das metZ-Gen kodiert (kodieren) verringert  
bzw. abschwächt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die  
katalytischen Eigenschaften der Polypeptide  
(Enzymprotein) abschwächt, für das die Polynukleotide  
metR und/oder metZ kodieren.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,  
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe
- 30 14.1 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,

- 14.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 14.3 das für die Pyruvat-Carboxylase  
kodierende Gen pyc,
- 5 14.4 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende  
Gen tpi
- 14.5 das für die Homoserin O-Acetyltransferase  
kodierende Gen metA
- 10 14.6 das für die Cystathionin-gamma-Synthase  
kodierende Gen metB
- 14.7 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
Gen pgk
- 14.8 das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende  
Gen aecD
- 15 14.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase  
kodierende glyA-Gen
- 14.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase  
kodierende metY-Gen

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 20 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,  
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
25 aus der Gruppe

- 15.1 das für die Homoserine Kinase kodierende Gen  
thrB
- 15.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen  
ilvA

- 15.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 15.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh
- 5 15.5 das für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodierende Gen pck
- 15.6 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi
- 15.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 10 abschwächt.
16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1f trägt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 15 Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
18. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
- 20 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 25 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-



Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet  
5 dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man  
zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-  
Methionin verstärkt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
10 teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-  
Methionin verringern.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression  
der Polynukleotide, die für das metR- und/oder metZ-  
15 Gen kodieren abschwächt, insbesondere ausschaltet.
22. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e  
t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium  
glutamicum einsetzt.
- 20 23. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet  
dass man zusätzlich noch eine oder mehrere folgender  
Schritte durchführt:
- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen  
25 Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-  
Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-  
Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d)  
erhaltenen Produkten;
- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach b) bis e)  
30 erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und  
Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der  
Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot  
und Kleie; oder

- g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.
- 5 24. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
- 10 26. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu 5 Gew.-% liegt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
- 15 28. Verfahren gemäß Anspruch 23, 24, 25, 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
- 20 29. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen 18 bis 28.
- 25 30. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-% L-Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs, enthält.
- 30 31. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die für die O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase (metZ) und/oder den Transkriptionsaktivator MetR kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des O-Succinylhomoserin-

5 Sulfhydrylase (metZ) Gens bzw. des  
Transkriptionsaktivators MetR aufweisen, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man das  
Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen  
gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als  
Hybridisierungssonden einsetzt.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft die für die metR und/oder metZ-Gene kodierenden Polynukleotide aus coryneformen Bakterien, die Polynukleotidsequenzen enthalten, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,
- 15 c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 20 d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
- e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) b), c) oder d), und
- 25 f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b), c), d) oder e)

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metR-Gen und/oder metZ-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die  
30 erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungs-sonden.